PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : G01N 33/543, 33/552, C12N 11/06	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/08770 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. März 1995 (30.03.95)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/03137

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. September 1994 (20.09.94)

(30) Prioritätsdaten:
P 43 32 003.1 21. September 1993 (21.09.93) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: SEEGER, Stefan [DE/DE]; Karlsbader Strasse 11, D-65824 Schwalbach (DE). HARTMANN, Andreas [DE/DE]; Pfarrstrasse 9, D-68549 Ilvesheim (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: SEEGER, Stefan; Karlsbader Strasse 11, D-65824 Schwalbach (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CN, CZ, HU, JP, KR, RU, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PROCESS FOR COATING SURFACES WITH BIOLOGICAL MOLECULES AND OTHER RECEPTOR MOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESCHICHTUNG VON OBERFLÄCHEN MIT BIOMOLEKÜLEN UND ANDEREN REZEPTORMOLEKÜLEN

(57) Abstract

A process is disclosed that uses the Langmuir-Blodgett technique to produce ultra-thin monolayers that contain receptor or biological molecules. Cross-linkable, non-amphiphilic matrix molecules are used, with which receptor and/or biological molecules are intercalated or covalently coupled. A new process, a modified Lemieux reaction, is disclosed for that purpose.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren beschrieben, das die Langmuir-Blodgett-Technik nutzt, um ultradünne Monoschichten, die Rezeptor- oder Biomoleküle enthalten, herzustellen. Dabei werden vernetzbare nicht-amphiphile Matrixmoleküle verwendet, in die Rezeptormoleküle und/oder Biomoleküle eingelagert werden, oder diese kovalent an die Matrixmoleküle angekoppelt werden. Hierzu wird ein neuartiges Verfahren, eine abgewandelte Lemieux-Reaktion, beschrieben.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Entwurf zur Offenlegungsschrift

Verfahren zur Beschichtung von Oberflächen mit Biomolekülen und anderen Rezeptormolekülen

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung beschreibt eine neuartige Immobilisierungstechnik, mit der DNS, Antikörper, Antigene, Enzyme, Hormone oder andere Peptide kovalent oder nicht kovalent an ein - mittels der Langmuir-Blodgett-Technik auf ein festes hydrophobisiertes Substrat übertragenes - nicht amphiphiles Photopolymer gebunden werden können. Die so dargestellten Schichten können als Meßsonden für Festphasensensoren eingesetzt werden und somit beispielsweise zum quantitativen Nachweis von Biomolekülen, Pestiziden oder sonstiger Analyte dienen.

Zum Nachweis biologischer Substanzen gibt es zahlreiche Methoden, von denen die Immunoassays in der klinischen Chemie die größte Bedeutung erlangt haben. das Prinzip zum Nachweis von Hormonen, Antikörpern oder anderen Proteinen beruht darauf, daß ein an eine Festphase adsorbiertes Rezeptormolekül spezifisch mit den zu bestimmenden Spezies reagiert. Durch den Einsatz einer Markierungstechnik (Fluoreszenzfarbstoff, radioaktive oder enzymatische Markierung) gelingt die quantitative Bestimmung des Analyten über eine Eichmessung [T. Porstmann and S. Kiessig, Journal of Immunological Methods, 150(1992)5]. Ein Nachteil der Immunoassays ist der hohe Zeitaufwand, da bei der Durchführung der einzelnen Schritte Inkubationszeiten von jeweils bis zu einer Stunde eingehalten werden müssen.

Deshalb ist es in der Praxis von Vorteil eine Meßsonde einzusetzen, welche das Rezeptormolekül (Antikörper, Peptid u.s.w.) bereits in immobilisierter Form enthält, so daß die Anzahl der Präparationsschritte eines Immunoassays für den klinischen Gebrauch verringert wird. Verschiedene Methoden der Immobilisierung von Proteinen sind daher in der Vergangenheit entwickelt worden. Einen Überblick findet man bei H. Weetall [H. Wetall, M. Lynn " immob. enzymes, antibodies, cells and peptides, preparation and charakterisation", M. Dekkar, Inc., New York, (1975) 497]. Die Immobilisierung erfolgt demgemäß meist über die Reaktion einer Aminogruppe des Biomoleküls mit einer Oxofunktion eines Stoffes, der als Verbindungsglied zwischen Oberfläche und zu immobilisierendem Molekül dient. Die bedeutendste Methode stellt hierbei die Silan-Glutaraldehydmethode dar, bei der ein Silan kovalent auf ein zuvor hinsichtlich seiner Hydroxylgruppen aktiviertes festes Substrat fixiert wird. Als Bindeglied zwischen Silanfilm und zu immobilisierendem Biomolekül dient dann Glutaraldehyd. Ein Nachteil herkömmlicher Immobilisierungstechniken liegt in der möglichen Bildung inhomogener globulärer Oberflächenstrukturen [S. Seeger, K. Bierbaum, R. Dahint, C. L. Feng, M. Mantar, and M. Grunze: Synthetic Microstructures in Biological Research, J.M. Schnur, M. Peckerar (Hrs.), Plenum Press New York, 53-66, 1992].

Diesen Nachteil vermeidet die Langmuir-Blodgett (LB)-Technik, mit der man ultradünne homogene Filme definierter Schichtdicke auf ein festes Substrat übertragen kann. Auf oder in diesen Filmen lassen sich dann - eventuell nach einer speziellen Aktivierungsreaktion - Biomoleküle immobilisieren. Einen Überblick über LB-Filme und deren Einsatzbereich in der Biosensorik liefert W. M. Reichert [W.M. Reichert, C. J. Bruckner and J. Joseph, Thin Solid Films, 152 (1987) 345]. Der Hauptvorteil der LB-Technik liegt in der Möglichkeit, eine gewünschte Anzahl Monolagen auf das Substrat zu übertragen und durch das Flächenübertra-

gungsverhältnis die Güte des Filmtransfers direkt beim Übertrag zu kontrollieren. Verwendet man dann nur die beschichteten Substrate, bei denen der Filmübertrag vollständig ist, so erhält man eine hohe Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse bei der Durchführung der restlichen Schritte eines Immunoassays. Wendet man die LB-Technik auf Stab-Haar-artige Polymere an, so gelingt der Transfer ultradünner Schichten mit molekular orientiertem Aufbau [E. Orthmann and G. Wegner, Angew. Chemie 98 (1986) 1114]. Ein Beispiel hierfür stellen Polyglutamate mit flexiblen Seitenketten dar, welche befähigt sind, Gastmoleküle in der flüssigen Seitenkettenmatrix aufzunehmen [G. Duda and G. Wegner, Makromol. Chem. Rapid Commun., 9 (1989 495)].

Ein weiterer Nachteil aller bisher geschilderter Methoden ist die fehlende definierte Orientierung der immobilisierten Biomoleküle. Im Falle von immobilisiertem Immunglobulin G ist die Anzahl aktiver Bindungsstellen deutlich geringer als die gesamte Menge an immobilisierten IgG, da oftmals die Antikörperbindungsstellen durch eine ungünstige Orientierung blockiert sind. Dies äußert sich vor allem in der verringerten Empfindlichkeit eines potentiellen Immunosensors.

Daher sind mehrere Methoden entwickelt worden um Proteine in gezielter Orientierung hinsichtlich der Substratoberfläche zu immobilisieren. V. Turko et al. beschreiben die Stabilisierung einer Vorzugsrichtung von IgG auf einem LB-Trog mit Protein A [I. V. Turko, S. Yurkevich and V. L. Chashchin, Thin Solid Films, 210 (1992) 710]. Außerdem kann man mit der Fromherzmethode ein Protein vom LB-Trog durch Waagerechtes Abstreifen in definierter Orientierung auf ein festes Substrat übertragen [T. Nakagawa and M. Kakimoto, T. Miwa and M. Aizawa, Thin Solid Films, 202 (1991) 151]. Obwohl durch diese Methodik Biomoleküle in hoher Belegungsdichte und definierter Orientierung übertragen werden, ist die praktische Anwendbarkeit dadurch begrenzt, daß die so dargestellten Bioschichten aufgrund fehlender chemischer Bindung zum LB-Film eine schlechte Langzeitstabilität aufweisen. Beim Aufbewahren in Pufferlösung lösen sich die lediglich physikalisch adsorbierten Biomoleküle ab, beim Aufbewahren an Luft erfolgt schon nach kurzer Zeit eine Inaktivierung durch Denaturierung der Proteinstruktur.

Daher wurde bereits nach Möglichkeiten geforscht, Antikörper, Enzyme oder andere Proteine kovalent an den LB-Film zu binden und so eine Stabilitätserhöhung zu erreichen. So veröffentlichte H. Gaub die orientierte Bildung einer Monolage eines F_{ab}-Fragments, das kovalent an ein Phospholipid gebunden ist [M. Egger, S. P. Heyn and H. E. Gaub, Biophys. J., Vol. 57 (1990) 669]. Die Haltbarkeit derartig immobilisierter Biommoleküle ist jedoch dadurch begrenzt, daß sich die nicht vernetzten Phospholipidfilme bei Lagerung in Pufferlösung mitsamt der immobilisierten Bioschicht vom Substrat ablösen.

Ein Hauptnachteil bisheriger Immobilisierungsmethoden liegt demnach in der mangelhaften Langzeitstabilität der Bioschichten, welche auf LB-Filmen immobilisiert wurden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Immobilisierungskonzept mit dem Biomoleküle (Antikörper, Antigene, Enzyme, DNS, Hormone u.a.) kovalent an eine quervernetzbare nicht

amphiphile LB-Filmsubstanz gebunden werden können. Ein nicht amphiphiler polymerisierbarer LB-Film wird - entweder vor und/oder nach dem LB-Transfer auf das speziell vorbehandelte Substrat - quervernetzt und danach hinsichtlich Biomolekül bindender Funktionen aktiviert, falls dies nicht schon in einem vorangehenden Schritt geschehen ist, oder Biomolekül bindende Funktionen bereits in der ursprünglichen Filmsubstanz vorhanden sind. Dieser Aktivierungsschritt entfällt auch dann, falls das Biomolekül, zusammen mit der Filmsubstanz auf dem Trog aufgespreitet wurde, so daß es in die Matrix des Photopolymers eingebaut wird. Ansonsten wird das Biomolekül nach einer weiteren eventuellen Vernetzungsperiode immobilisiert, indem es entweder über die LB-Technik auf das Substrat übertragen wird und danach automatisch mit der Filmsubstanz reagiert oder das Substrat in einer Lösung des Biomoleküls inkubiert. Es können auch mehrere LB-Filmsubstanzen und/oder mehrere Biomoleküle kombiniert eingesetzt werden.

Demgemäß besteht die vorliegende Erfindung aus einer neuen Immobilisierungsmethode für Biomoleküle, welche folgendermaßen aufgebaut ist:

a) Übertrag einer oder mehrerer Monolagen einer zwei- oder dreidimensional photochemisch vernetzbaren Filmsubstanz auf ein Substrat. Es können auch verschiedene LB-Filmsubstanzen kombiniert eingesetzt werden. Mindestens eine der beteiligten LB-Substanzen ist dabei photochemisch vernetzbar und nicht amphiphiler Natur, oder aber eine nicht amphiphile Substanz wird erst in Kombination mit den restlichen LB-Filmsubstanzen oder durch Zusatz gewisser Sensibilisatoren photochemisch vernetzbar gemacht. Die Vernetzung der LB-Filme erfolgt entweder vor und/oder nach dem Filmübertrag und entweder vor und/oder nach dem Einbau bzw. der Immobilisierung der Biomoleküle.

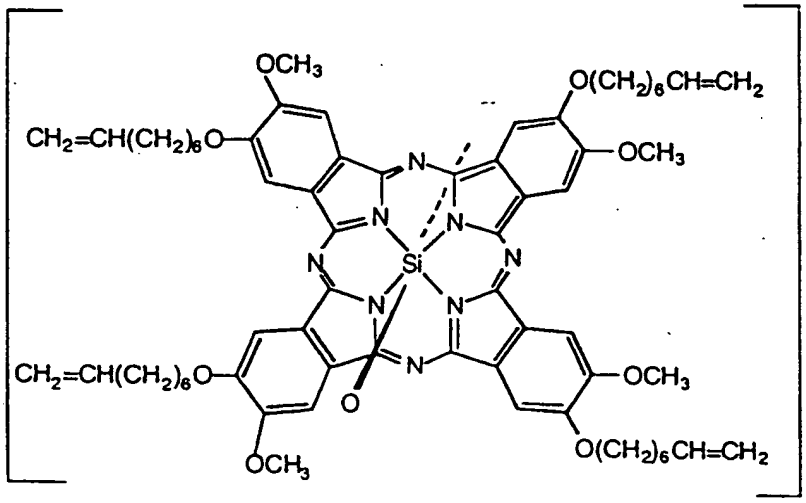
b) Einbau der zu immobilisierenden Rezeptor-Biomoleküle oder Partikel (Antikörper, Antikörperfragmente, Enzyme, Hormone, Antigene, DNS, Zellen, Viren, Peptide, ionenselektive Krononether u. a.) in die Polymermatrix entweder vor dem Filmübertrag durch Cospreiten mit der Filmsubstanz und gemeinsamem Aufzug des Substrats, oder durch Immobilisierung auf der Biomolekül bindende Funktionen enthaltenden Filmsubstanz nach dem Übertrag.

c) Eine eventuell notwendige Aktivierung der Filmsubstanz zur Darstellung Biomolekül bindender Funktionen kann mit einem wiederverwertbaren Oxidationsreagens in einer heterogenen Reaktion vom Lemieux Typ erfolgen, so daß olefinische Doppelbindungen in Oxofunktionen überführt werden.

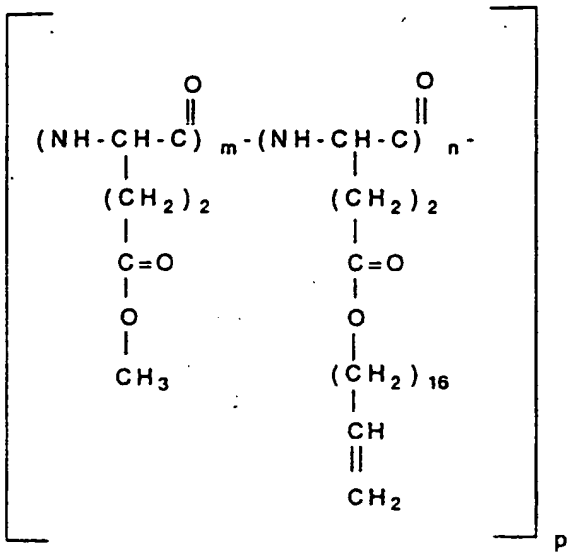
d) Die Immobilisierung des Biomoleküls kann - wenn nicht schon durch Cospreiten mit der Filmsubstanz geschehen - auf kovalente Weise dadurch erfolgen, daß die Biomoleküle entweder per LB Technik oder durch Inkubieren in einer Lösung der Biomoleküle über tragen werden. Es können auch verschiedene Biorezeptoren unterschiedlicher Spezifität auf ein und dasselbe Substrat immobilisiert werden.

Die Immobilisierung von biologischen Rezeptormolekülen auf amphiphilen LB Filmen zur Entwicklung eines optischen Biosensors, der auf der Basis des Fluoreszenz-Energietransfers beruht, wurde von Hugl und Mitarbeitern beschrieben [H. Hugl et al., Deutsches Patentamt: DE 4013713]. Im Unterschied dazu beschreibt die vorliegende Erfindung die Immobilisierung von Biomolekülen auf *nicht*-amphiphilen LB Filmen, die auf ein hydrophobes Substrat aufgezogen werden. Aufgrund des "Stab-Haar-Konzepts" neigen solche LB Filme nicht zur Domänenbildung, wie dies bei amphiphilen Filmen der Fall ist [E. Orthmann, G. Wegner, Angew. Chem., 98 (1986) 1114]. Daher haben die nach der vorliegenden Erfindung hergestellten Filmoberflächen einen homogeneren Aufbau. Auch nach der photochemischen Vernetzung bleibt dieser bis in molekularen Dimensionen erhalten. Als Träger (Substrate) kommen alle bekannten Materialien in Frage, welche für nicht amphiphile Filmsubstanzen geignet sind, wie z. B. hydrophobisiertes Glas, Quarzglas, Lithiumniobat, Silicium (u. a. Metalle), hydrophobe Kunststoffe, Folien, Membrane oder sonstiges hydrophobes Material. Auch hydrophobisierte Zähne, Knochen, Teile von Organimplantaten können in Frage kommen. Außerdem eignen sich hydrophobisierte Fasern aus Glas, Kunststoff u.s.w.. Zusätzlich zu einer eventuell notwendigen Hydrophobisierung nicht hydrophober Substrate, können diese vorher hinsichtlich hydrophiler Gruppen aktiviert werden. Beispielsweise werden hydrophile Hydroxygruppen durch Wasserstoffperoxid und Salzsäure aktiviert. Ein hierfür geignetes Hydrophobisierungsreagens ist Dimethyldichlorosilan.

Als Filmsubstanzen eignen sich eindimensionale verknüpfte Polymere, welche die Eigenschaft haben, photochemisch vernetzbar zu sein. Bevorzugt eingesetzt werden hierbei nicht amphiphile LB-Filme, da sie als Stab-Haar-Polymere die Möglichkeit der molekularen Orientierung implizieren, und so LB-Filme gezielter Architektur auf das Substrat übertragen werden können [G. Wegner, Thin Solid Films, 216 (1992) 105-116]. Ein Beispiel hierfür ist ein mit Alkylketten substituiertes Phtalocyaninatopolysiloxan-Derivat [E. Orthmann, G.



Wegner, Angew. Chem., 98 (1986) 1114] mit terminalen olefinischen Doppelbindungen:



Ein weitere Klasse nicht amphiphiler Filmpolymere stellen Polyglutamate [G. Duda, A. J. Schouten, T. Arndt, G. Lieser, G. F. Schmidt, C. Bubeck and G. Wegner, Thin Solid Films, 159 (1988) 221] dar, welche ebenfalls Stab-Haar-Polymere bilden:



Außerdem kommen die gleichen Substanzklassen in Frage, wenn sie anstelle der olefini-

schen Endgruppen andere photochemisch quervernetzbare Gruppen enthalten, wie z.B. Carbonyl-, Thionyl-, Iminogruppen oder auch Kohlenstoffdreifachbindungen. Außerdem muß sich die vernetzbare Gruppe nicht unbedingt am Ende der Alkylseitenketten befinden. Sie kann sich auch an einer anderen Stelle befinden. Neben nicht amphiphilen Filmen, lassen sich auch solche amphiphiler Natur, wie zum Beispiel Fettsäuremoleküle mit vernetzbaren olefinischen Doppelbindungen verwenden [J. P. K. Peltonen, H. Pingsheng and J. B. Rosenholm, Thin Solid Films, 210/211 (1992) 372]:

Allerdings läßt sich auf diese Art und Weise keine gezielte Molekülarchitektur gemäß dem Stab-Haar-Konzept betreiben.

Weitere einsetzbare Filme sind Cyclodextrine, Polysaccharidfilme, Polysiloxanfilme u. a. , welche alle mit Alkylseitenketten substituiert sind und an diesen Substituenten tragen, welche sie polymerisierbar machen.

Die zur Kombination mit den bisher besprochenen LB-Filmsubstanzen geigneten Substanzen sind entweder selbst derartige Filmsubstanzen, oder aber sie fungieren als Sensibilisatoren, die das für die photochemische Vernetzung notwendige Licht absorbieren und auf die vernetzbare Filmsubstanz übertragen. Hierbei kann der Sensibilisator auch selbst vernetzbar sein. Eine geignete Kombination stellt zum Beispiel Copolyglutamat und Pcps dar. Copolyglutamat ist mangels Licht absorbierender Gruppen nicht vernetzbar, läßt sich jedoch unter Anwesenheit von Pcps bei 254 nm oder anderer Sensibilisatoren photochemisch polymerisieren (s. Beispiel 8).

Für den Übertrag der Filme auf das Substrat eignet sich die Langmuir-Blodgett-Technik. Hierbei spielt es keine Rolle, ob das Substrat senkrecht eingetaucht wird, oder der Film durch waagrechtes Abstreifen aufgezogen wird. Als Subphase für die Filmsubstanzen eignet sich idealerweise entionisiertes und mit einer Milliporeanlage gereinigtes Wasser. Aber auch Salz- und Pufferlösungen kommen- je nach eingesetzter Filmsubstanz - in Frage. Der Übertrag findet bei Oberflächenspannungen von 10 bis 50 mN/m statt und bei Temperaturen zwischen 0 °C und 50 °C.

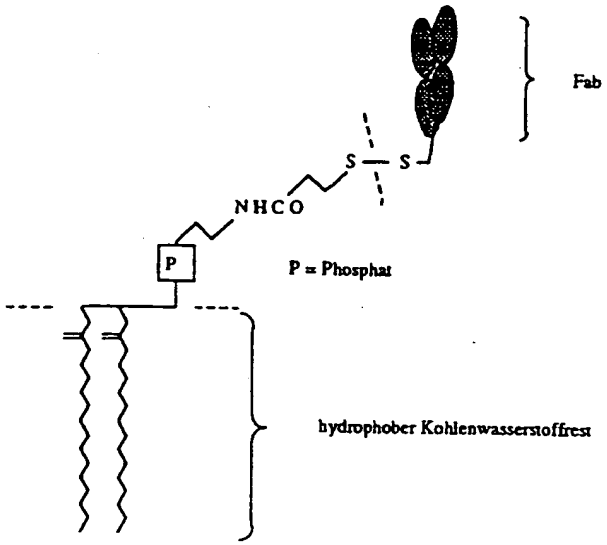
Die Vernetzung der Photopolymere kann bereits vor dem Filmübertrag stattfinden. Hierbei empfiehlt es sich die Filmsubstanz(en) direkt auf dem Trog mit einer UV-Lampe zu bestrahlen. Als Lichtquelle eignet sich prinzipiell jede UV-Lampe.

Dies gilt auch für eine Vernetzung nach dem Filmübertrag. Die Vernetzung von Pcps gelingt mit einer Quecksilberniederdrucklampe der Leistung 30 Watt in 15 cm Entfernung von der Filmsubstanz bei 254 nm. Übliche Bestrahlungsdauern liegen zwischen 5 Minuten und mehreren Stunden. Je länger bestrahlt wird, umso größer wird jedoch die Gefahr einer möglichen Photozerstörung der Filme. Falls das zu immobilisierende Biomolekül oder ein geignetes Derivat mit den Filmsubstanzen auf dem LB-Trog cogespreited wird und vor oder nach dem

Filmübertrag die photochemische Vernetzung durchgeführt wird besteht zusätzlich die Gefahr der Denaturierung der Biomoleküle.

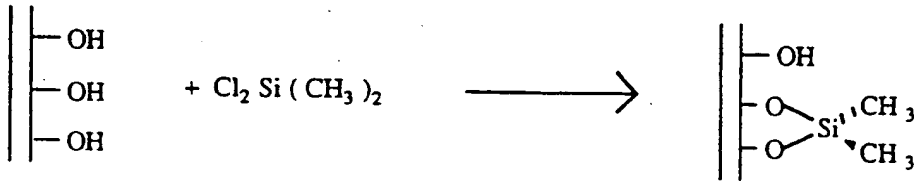
Bei der Vernetzungsreaktion reagieren ungesättigte Gruppen miteinander. Die photochemische Polymerisierung von olefinischen Doppelbindungen kann zum einen als [2]+[2]-Addition erfolgen, wodurch bi- oder polyfunktionelle Monomerbausteine quervernetzt werden. Denkbar ist auch eine Radikalkettenpolymerisation. Diese kann zum Beispiel auch über einen Initiator gestartet werden, der UV Licht absorbiert und so die für die Bildung reaktiver Spezies notwendige Energie liefert [N. S. Allen: "Photoinitiators for Ultraviolett Curing", Trends in Polymer Science, Vol. 1, No. 7 (1993) 213]. Hierbei haben sich Acrylgruppen (C=C-C=O) als reaktivste Gruppen für eine photochemische Vernetzung mit Photoinitiatoren erwiesen [N. S. Allen, and M. Edge, J. Oil Colour Chem. Assoc. 73 (1990)438]. Diese haben zudem den Vorteil nach ihrer Vernetzung noch Biomolekül bindende Oxogruppen zur Verfügung zu stellen, so daß eine weitere Aktivierungsreaktion entfällt.

Falls die Filmsubstanzen hinsichtlich Biomolekül bindender Funktionen aktiviert werden müssen, eignet sich die oxidative Spaltung von Kohlenstoffdoppelbindungen mit Osmiumtetroxid und Natriumperjodat nach Art der Lemieuxreaktion. Verbrauchtes Osmiumtetroxid wird dabei während der Reaktion vom überschüssigen Perjodat immer wieder nachgebildet. Die Literatur [R. Pappo, D. S. Allen, R.U. Lemieux, and W. S. Johnson, J. Org. Chem. 21, 478 (1956)] beschreibt das Arbeiten mit einer Lösung des Olefins in einem Ether-Wasser-Gemisch. Für die Oxidation der Filmsubstanz vor dem Übertrag auf den Träger kann diese Variante direkt übernommen werden. Soll jedoch der LB-Film (mit olefinischen Gruppen) erst nach dem Übertrag auf das Substrat oxidiert werden, so impliziert dies eine andere Reaktionsführung: Hierfür wird auf den Einsatz von Ether verzichtet, der die Filmsubstanz vom Substrat ablösen würde. Die Oxidation der terminalen Doppelbindungen kann demge-



mäß nur an der Grenzfläche zwischen flüssiger Phase (Wasser, Osmiumtetroxid und Natriumperjodat) und fester Phase (festes Substrat und LB-Film als flüssig kristalliner Phase) stattfinden.

Ein Beispiel für ein immobilisierbares Biomolekül stellt die Klasse der Immunglobuline dar. Immunglobuline zählen zu den Eiweißstoffen und besitzen demgemäß Aminogruppen enthaltende Bausteine. Diese reagieren in bekannter Art und Weise mit Aldehydgruppen der Filmsubstanzen zu Imingruppen. Eine Reduktion der Imingruppen zu Amingruppen führt zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Bindung. Noch stabiler sind Amidgruppen, weshalb man auch Estergruppen der Filmsubstanzen mit den Aldeydgruppen reagieren läßt. Dies ist in der Literatur bereits beschrieben worden [H. Wetall, M. Lynn " immob. enzymes, antibodies, cells and peptides, preparation and characterisation", M. Dekkar, Inc., New York, (1975) 497]. Andere Biomoleküle lassen sich - sofern sie den Eiweißen angehören - analog immobilisieren. Wenn die Biomoleküle mit den Filmsubstanzen cogespreitet werden sollen, so müssen sie geeignet substituiert sein. Geignet sind zum Beispiel $f_{ab'}$-Fragmente des IgG, die an ihren Thiogruppen mit einem längerkettigen Kohlenstoffrest substituiert sind, wie dies bereits Gaub et al. beschrieben haben [M. Egger, S. P. Heyn, and H. E. Gaub: "Two-dimensional recognition pattern of lipid-anchored $f_{ab'}$ fragments", Biophys. J., Vol. 57 (1990) 669]:



Ein derartig substituiertes Biomolekülfragment sollte sich auf dem LB-Trog zusammen mit einer photochemisch vernetzbaren Substanz cospreiten lassen. Vor oder nach dem Übertrag auf das Substrat wird dann der Film vernetzt, wodurch das Biomolekül fixiert wird. Der Vorteil hierbei ist, daß durch die LB-Technik die gewünschte einheitliche Orientierung aller zu immobilisierender Moleküle erreicht wird, was sich in einer erhöhten Bioaktivität und einer damit einhergehenden Erhöhung der Empfindlichkeit eines potentiellen Biosensors äußert.

Beispiel 1

Nach verschiedenen Vernetzungszeiten auf dem LB-Trog wurden Schubflächendiagramme angefertigt, mit dem Ergebnis, daß zunehmende Vernetzungszeiten erhöhte Kollapsdrücke zur Folge haben. So liegt der Kollapsdruck nach 87 Minuten Vernetzung bei 45 mN/m (Raumtempeatur). Eine unvernezte Probe hat dagegen einen Kollapsdruck von nur 34 mN/m (Raumtemperatur). Mit zunehmender Bestrahlungsdauer nimmt also der Polymerisationsgrad zu. Nach eineinhalb Stunden ist der Polymerisationsprozeß noch nicht abgeschlossen. Analoge Untersuchungen am Beispiel eines Fettsäurederivats mit terminalen Kohlenstoffdoppelbindungen wurden von Peltonen et al. durchgeführt [J. P. K. Peltonen, H. Pingsheng and J. B. Rosenholm, Thin Sol. Fi., 210/211, (1992), 372]. Die entsprechende Vernetzung von auf das Substrat übertragener Filme, ist ebenfalls mit Erfolg durchgeführt worden (s.u.).

Beispiel 3

Oxidation einer Monolage Pcps auf Glas:

Zu 1,6 ml Wasser (Milipore gereinigt) fügt man 0,9 µl Osmiumtetroxid in tert-Butanol (1 ng/µl) und das Substrat zu und rührt 5 Minuten. Dann gibt man bei Raumtemperatur 0,05g Natriumperjodat zu und läßt ca 2 Stunden - unter gelegentlichem Schütteln - ruhen. Danach wird mit einer Phosphatpufferlösung und Tween-20 (einem Detergens) gespült.

Die so präparierten Substrate zeigen eine hohe Affinität hinsichtlich nucleophiler Aminogruppen von Antikörpern, was mit einem enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) überprüft wurde (s.u.).

Beispiel 4

Immobilisierung von Immunglobulin G, Blockierung, ELISA:

Die Immobilisierung von IgG erfolgte gemäß dem Fachmann bekannter Vorschriften:

Die oxidierten Polymerfilme auf Glas werden in eine Lösung von 5 µl Ziege-anti-Kaninchen IgG in 1 ml PBS gestellt und dann ca. eine Stunde darin bei 4° C belassen.

Nach einem kurzen Spülvorgang mit PBS-Tween 20 werden die nicht abreagierten Aldehydfunktionen durch Ethanolamin blockiert, indem man die Proben für 15 Minuten einer Lösung von 50 µl Ethanolamin und 1 ml PBS aussetzt.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween 20 und Spülen erfolgt eine Stunde Inkubation mit 5 µl Kaninchen-anti-Pferd IgG-POD-Konjugat in 1 ml PBS, oder beim Blindwert (Kontrolle der unspezifischen Adsorption von IgG) die gleiche Menge Ziege-anti-Meerschweinchen IgG-POD-Konjugat.

Schließlich wird erneut drei Mal gewaschen und gespült, und das Glasstückchen in eine Küvette mit Rührvertiefung und Mikrorührfisch gestellt, und mit der auf Raumtemperatur befindlichen ELISA-Substratpufferlösung (2,5 ml) gefüllt. Das Glasstückchen befindet sich nicht im Lichtgang des UV-Vis- Photometers. Nun gibt man einen Mikroliter Wasserstoffperoxid zu und registriert alle 30 Sekunden bei 405 nm die Extinktion (vorher Nullabgleich),

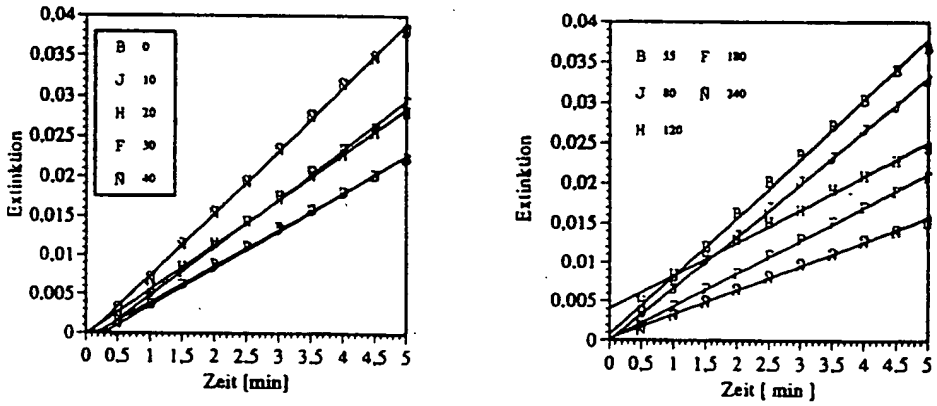
welche mit der Farbstoffentwicklung zunimmt. Die Steigung der Extinktionsgeraden wird dann mit einer Eichmessung verglichen und so die Menge an aktivem immobilisiertem IgG ermittelt.

Wird IgG auf einem Pcps-Film immobilisiert, der 1 Stunde vernetzt wurde, so erhält man demgemäß eine Belegungsdichte von 0,09 ng/mm^2. Die unspezifische Adsorption, welche mit einem Blindantikörper getestet wurde beträgt ca. 10 %. Ein Pcps-Film, auf dem keine Aldehydgruppen generiert wurden, zeigt demgegenüber eine deutlich geringere Antikörperaffinität: Es ergeben sich Belegungsdichten, die im Bereich der unspezifischen Adsorption liegen.

Beispiel 5

Abhängigkeit der aktiven Antikörperbelegungsdichten von der Bestrahlungsdauer der Pcps-Filme:

Wenn man 10 Monolagen Pcps auf hydrophobisiertem Glas unterschiedlich lange bestrahlt, und darauf Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG) immobilisiert, erhält man unterschiedliche ELISA-Geradensteigungen der Positivkontrollen (Kaninchen-anti-Pferd IgG-POD-Konjugat). Dies zeigt folgende Abbildung:



Berechnet man mit Hilfe der Eichmessung die daraus die aktiven Belegungsdichten, so erhält man die Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer.

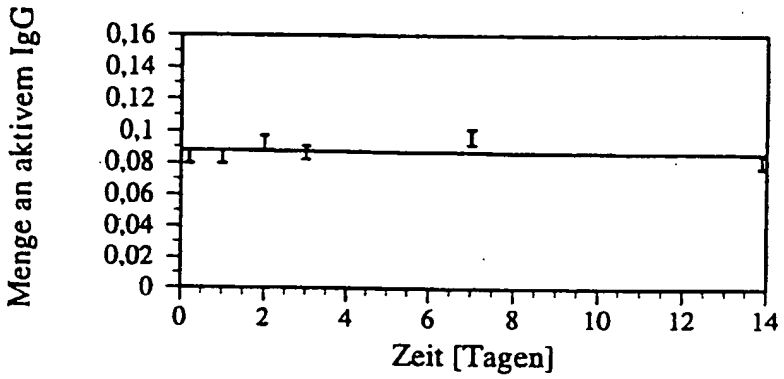
Je länger bestrahlt wird, umso weniger Doppelbindungen verbleiben für die Generierung von Antikörper bindenden Aldehydfunktionen. Wäre dies der einzige Effekt, so müßte eine zunehmende Belichtungszeit eine abnehmende Belegungsdichte zur Folge haben. Also muß noch ein zweiter Effekt berücksichtigt werden. Die Höhe des von der Länge der Lichteinwirkung abhängigen Vernetzungsgrads bedingt die Stabilität des Films. Je länger also bestrahlt wurde, umso weniger Antikörper geht verloren, wenn sich nach der Immobilisierung (z. B. in den Waschschritten) Teile der Filmsubstanz mit darauf befindlichem IgG von der Glasoberfläche ablösen.

Die Gegenläufigkeit dieser Effekte erklärt das Maximum der Belegungsdichte.

Beispiel 6

Stabilität der Antikörperfilme auf Pcps:

Um die Haltbarkeit der immobilisierten Antikörper zu testen, wurden aktivierte hydrophobisierte Glasstückchen mit 10 LB-Monolagen Pcps III (25 mN/m) beschichtet, 55 Minuten bei 254 nm vernetzt, dann mit Osmiumtetroxid / Perjodat oxidiert, schließlich Ziege-anti-Kaninchen IgG immobilisiert und - nach der Blockierungsreaktion -in Phosphatpuffersalzlösung eingefroren. Nach verschiedenen Lagerzeiten wurden per ELISA-Test die aktiven Belegungsdichten bestimmt:



Die Aktivität der Antikörperfilme bleibt also für eine Dauer von zwei Wochen konstant. Die Filme sind offensichtlich durch die photochemische Vernetzung ausreichend stabilisiert worden. Eine Untersuchung der Stabilität an Luft ergibt dagegen einen drastischen Aktivitätsverlust innerhalb weniger Tage, da die Antikörper an Luft denaturiert werden.

Beispiel 8

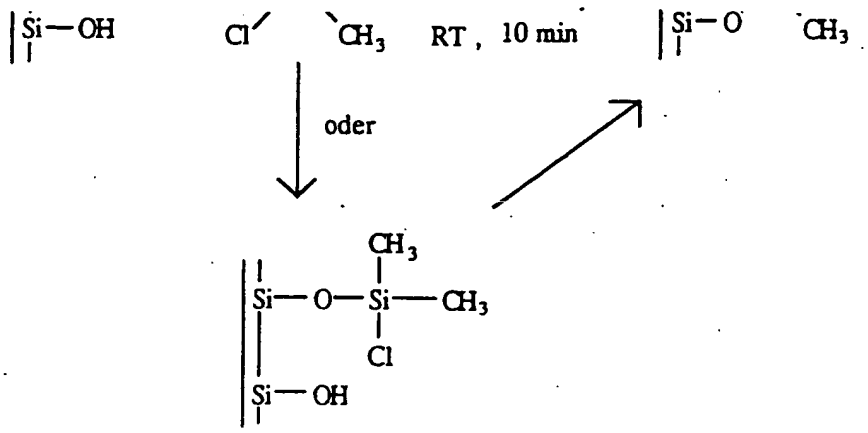
Vernetzung einer Monolage Pcps / Copolyglutamat:

Durch Arbeiten bei tieferen Temperaturen (15 °C: Anschluß eines Kryostaten an den LB-Trog) konnte der Kollapsdruck des Copolyglutamats aus Beispiel 7 auf 30 mN/m erhöht werden . Ferner bewirkte der Zusatz von 15 Masseprozent Pcps einen weiteren Anstieg auf insgesamt 33 mN/m . Dies ermöglichte den erneuten Versuch einer Vernetzung bei nunmehr 28 mN/m auszuführen. In der Tat wurden Ergebnisse wie bei Beispiel 2 beobachtet, d.h. die Filmfläche nahm während der Bestrahlung kontinuierlich ab, und der Kollapsdruck entsprechend zu. Demgemäß gelang die photochemische Vernetzung. Ein Grund dafür ist einerseits die durch die erhöhte Oberflächenspannung bewirkte Annäherung der olefinischen Doppelbindungen, wodurch sie eher vernetzbar werden. Andererseits wirkt Pcps als Sensibilisator, d. h. es dient zur Aufnahme des UV-Lichts, welches es dann auf das Copolyglutamat überträgt. Selbstverständlich können auch andere Sensibilisatoren hunzugegeben werden.

Der relativ geringe Beitrag der Vernetzung des Anteils an Pcps dürfte innerhalb der Fehlergrenzen vernachlässigbar sein, so daß die registrierte Flächenabnahme und Oberflächenspannungszunahme in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer auf eine photochemische Reaktion des Copolyglutamats zurückzuführen ist.

Beispiel 9

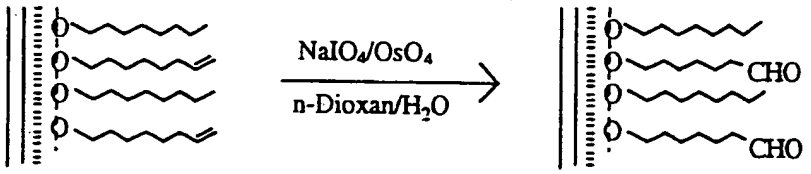
Gemäß der Beispiele 1-5 läßt sich also ein Beispiel für ein mögliches Immobilisierungskonzept wie folgt entwickeln:



2 .) Beschichtung des hydrophobisierten Glasstückchens mit einem LB-Film

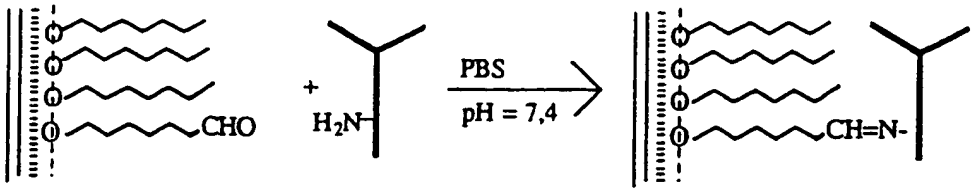
3.) Partielles "Anvernetzen" der am Film-Molekül befindlichen -terminalen- olefinischen Doppelbindungen mit UV - Licht (254 nm)

4.) Oxidation von bisher unvernetzten Doppelbindungen zu Aldehydfunktionen:



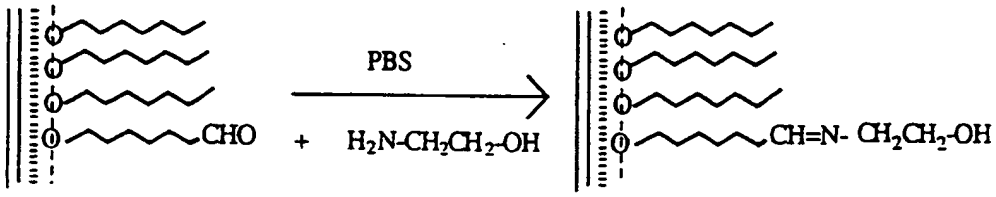
= Glasoberfläche = Hydrophob. Schicht =LB-Filmgerüst ohne Kohlenstoffkette

5.) Immobilisierung von Ziege-anti-Kaninchen IgG:



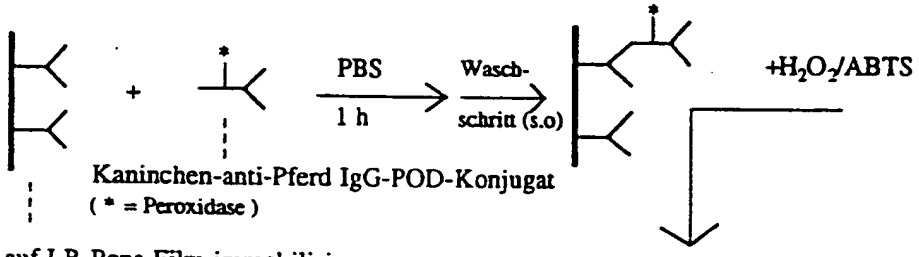
6.) Waschschritt: Entfernung von nicht immobilisiertem IgG

7.) Blockierung nicht abreagierter Aldehydfunktionen:
(Umwandlung in Iminfunktionen durch Ethanolamin)

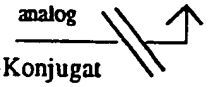


8.) ELISA:

a) Positivkontrolle:



b) Negativkontrolle (Blindwert):



mit Ziege-anti-Meerschweinchen IgG POD-Konjugat

Patentansprüche

1. Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen auf oder in photochemisch vernetzbaren nicht amphiphilen Langmuir-Blodgett-Filmen, dadurch gekennzeichnet, daß als Matrix eine nicht-amphiphile zwei- oder dreidimensional vernetzbare Substanz mit Hilfe der Langmuir- Blodgett-Technikeingesetzt wird um Rezeptor- oder Biomoleküle an oder in diese Schicht zu binden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix vernetzbar, bevorzugt photochemisch vernetzbar ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Marixmoleküle funktionelle Gruppen an Seitengruppen besitzen, um Rezeptor- oder Biomoleküle zu binden, wie z.B. Carbonyl-, Thionyl-, Imingruppen, C-C-Dreifachbindungen, bevorzugt jedoch C-C-Doppelbindungen.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik auf das Substrat aufgebracht wird und anschließend Rezeptor- oder Biomoleküle kovalent immoblisiert werden.

5. Verfahren nach Anspruch 1,2, und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik auf das Substrat aufgebracht wird, die Rezeptor- oder Biomoleküle jedoch zuvor mit der Matrixsubstanz cogespreitet wurden.

6. Verfahren nach Anspruch 1,2, 3 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik auf das Substrat aufgebracht wird, die Rezeptor- oder Biomoleküle jedoch so chemisch modifiziert wurden, daß sich ein an die Rezeptor- oder Biomoleküle angefügter weiterer Molekülteil derart in die Matrixsubstanz einlagert, daß die Rezeptor- oder Biomoleküle mit ihren bindungsfähigen Gruppen aus der Matrixsubstanz herausragen und zwar derart, daß sie ihre Aktivität noch besitzen.

7. Verfahren nach Anspruch 1,2, 3 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix aus mehreren unterschiedlichen nicht-amphiphilen Substanzen oder einer Mischung aus amphiphilen und nicht-amphiphilen Substanzen besteht.

8. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 dadurch gekennzeichnet, daß die funktionellen Gruppen der Matrixmoleküle durch eine Lemieux-Reaktion auf dem Substrat zu Aldehydgruppen oxidiert werden, jedoch kein organisches Lösungsmittel zugesetzt wird

9. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 dadurch gekennzeichnet, daß Rezeptor- oder Biomoleküle unterschiedlicher Bindungsspezifität in oder an ein und demselben Film gebunden sein können.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No
PCT/EP 94/03137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/543 G01N33/552 C12N11/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	THIN SOLID FILMS (1994), 245(1-2), 206-10 CODEN: THSFAP;ISSN: 0040-6090, 1994 Hartmann, A. et al 'Direct immobilization of antibodies on phthalocyaninato-polysiloxane photopolymers' see the whole document ---	1-9
A	THIN SOLID FILMS, vol.210/211, no.1-2, 30 April 1992, LAUSANNE CH pages 710 - 712 I.V. TURKO ET AL. 'Oriented immunoglobulin G layer onto the Langmuir-Blodgett films of protein A' cited in the application see the whole document --- -/--	1-7,9

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 February 1995	01. 03. 95

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Döpfer, K-P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr ial Application No
PCT/EP 94/03137

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ADV. MATER. (WEINHEIM, FED. REPUB. GER.) (1991), 3(7-8), 388-91 CODEN: ADVMEW;ISSN: 0935-9648, 1991 SCHUHMANN, WOLFGANG ET AL 'Immobilization of enzymes on Langmuir - odgett films via a membrane-bound receptor. Possible applications for amperometric biosensors' see the whole document	1-7,9
A	THIN SOLID FILMS, vol.210/211, no.1-2, 15 April 1992, LAUSANNE CH pages 372 - 374 J.P.K. PELTONEN ET AL. 'The polymerization of monolayers of some unsaturated fatty acids' cited in the application see the whole document	1-7,9
A	THIN SOLID FILMS (1989), 180, 61-4 CODEN: THSFAP;ISSN: 0040-6090, 1989 OWAKU, K. ET AL 'Preparation and characterization of protein Langmuir - odgett films' see the whole document	1-7,9
A	THIN SOLID FILMS, vol.216, no.1, 16 August 1992, LAUSANNE CH pages 105 - 116 GERHARD WEGNER 'Ultrathin films of polymers: architecture, characterization and properties' cited in the application	
A	THIN SOLID FILMS, vol.152, 1987, LAUSANNE CH pages 345 - 376 W.M. REICHERT ET AL. 'Langmuir-Blodgett Films and Black Lipid Membranes in Biospecific Surface-Selective Sensors' cited in the application	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen
PCT/EP 94/03137

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/543 G01N33/552 C12N11/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	THIN SOLID FILMS (1994), 245(1-2), 206-10 CODEN: THSFAP;ISSN: 0040-6090, 1994 Hartmann, A. et al 'Direct immobilization of antibodies on phthalocyaninato-polysiloxane photopolymers' siehe das ganze Dokument ---	1-9
A	THIN SOLID FILMS, Bd.210/211, Nr.1-2, 30. April 1992, LAUSANNE CH Seiten 710 - 712 I.V. TURKO ET AL. 'Oriented immunoglobulin G layer onto the Langmuir-Blodgett films of protein A' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/--	1-7,9

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
15. Februar 1995	01. 03. 95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Döpfer, K-P

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern ales Aktenzeichen
PCT/EP 94/03137

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ADV. MATER. (WEINHEIM, FED. REPUB. GER.) (1991), 3(7-8), 388-91 CODEN: ADVMEW;ISSN: 0935-9648, 1991 SCHUHMANN, WOLFGANG ET AL 'Immobilization of enzymes on Langmuir - odgett films via a membrane-bound receptor. Possible applications for amperometric biosensors' siehe das ganze Dokument	1-7,9
A	THIN SOLID FILMS, Bd.210/211, Nr.1-2, 15. April 1992, LAUSANNE CH Seiten 372 - 374 J.P.K. PELTONEN ET AL. 'The polymerization of monolayers of some unsaturated fatty acids' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-7,9
A	THIN SOLID FILMS (1989), 180, 61-4 CODEN: THSFAP;ISSN: 0040-6090, 1989 OWAKU, K. ET AL 'Preparation and characterization of protein Langmuir - odgett films' siehe das ganze Dokument	1-7,9
A	THIN SOLID FILMS, Bd.216, Nr.1, 16. August 1992, LAUSANNE CH Seiten 105 - 116 GERHARD WEGNER 'Ultrathin films of polymers: architecture, characterization and properties' in der Anmeldung erwähnt	
A	THIN SOLID FILMS, Bd.152, 1987, LAUSANNE CH Seiten 345 - 376 W.M. REICHERT ET AL. 'Langmuir-Blodgett Films and Black Lipid Membranes in Biospecific Surface-Selective Sensors' in der Anmeldung erwähnt	

1